

## KARBON KAYNAĞI OLARAK PEYNİRALTI SUYU ATIĞI KULLANILARAK RAMNOLİPİT BİYOSÜRFEKTANI ÜRETİMİ

Mustafa KAHYAOĞLU\*, Vahit KONAR\*\*

\*Siirt Üniversitesi Eğitim Fakültesi, 56100, Siirt

\*\*Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 23119, Elazığ

### ÖZET

Bu çalışmada karbon kaynağı olarak süt fabrikasının atık maddesi olan peyniraltı suyu kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071'dan ramnolipit biyosurfektanı elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla peyniraltı suyu ortamında *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071'in toplam hücre sayısı, ramnolipit miktarı, indirgen şeker miktarı ve kimyasal oksijen isteği araştırılmıştır.

Yapılan çalışma sonunda karbon kaynağı olarak peyniraltı suyu atığında *P.aeruginosa*'nın üreyip çoğaldığı görülmüştür. Besi ortamındaki toplam hücre sayısı  $9,5 \times 10^9$ /ml, en yüksek ramnolipit miktarı 0,48 g/l ve peynir altı suyunun kimyasal oksijen yükünün 90. t % 27 oranında azaldığı tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyosurfektan, *Pseudomonas aeruginosa*, Ramnolipit,

### RHAMNOLIPID BIOSURFACTANT PRODUCTION BY USING THE CHESSES WHEY WASTE AS CARBON SOURCE

#### ABSTRACT

In this study, we attempted to rhamnolipid biosurfactant production from *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 using chesses whey which is waste of milk factory as carbon source. For this purpose we searched total cell count, the production of rhamnolipit and chemical oxygen load of *P. aeruginosa* DSM 50071 growing on chesses whey waste medium.

Result from this study showed that the growth of *P.aeruginosa* using chesses whey waste as carbon source. The maximum production of rhamnolipid 0,48 g/l, total cell count  $9,5 \times 10^9$ /ml. and the chemical oxygen load of chesses whey waste was reduced by 27 % in 90 h.

**Key Words:** Biosurfactant, *Pseudomonas aeruginosa*, Rhamnolipid,

---

Bu çalışma FUBAP 658 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

## 1. GİRİŞ

Endüstride ham maddeler belli bir amaca göre işlenirken bazı maddelerde atık madde olarak ortaya çıkmaktadır. Dünya’da hemen her yıl milyonlarca ton atık madde çevreye atılmaktadır. Bu atık maddelerin yok edilmesi çeşitli endüstri kuruluşlarına büyük yükler getirmektedir. Örneğin tahıl ürünlerinin % 60’ı, yağlı tohum ürünlerinin % 85’i, şeker ürünlerinin % 90’nı atık madde olarak ortaya çıkmaktadır [1, 2].

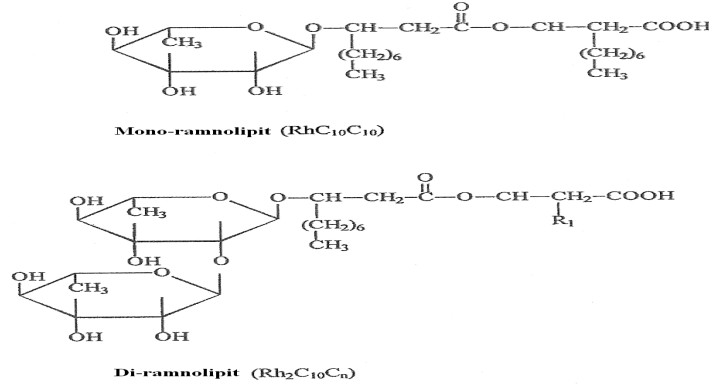
Bu atık maddelerden biride peyniraltı suyudur. Peyniraltı suyu; süttün peynir mayası veya organik asitlerle pıhtılaştırılmasından ve peynirin esasını oluşturan pıhtının alınmasından sonra geri kalan yeşilimsi sarı renkte sıvı kısımdır. Peyniraltı suyu atığının ortalama % 6’sı kuru madde, %0,05-1’i yağ, % 0,5 – 1,8’i protein, % 4 - 5’i laktoz, % 0,5 -2’si mineral maddelerden oluşmaktadır. Zengin besin içeriğine sahip ve üretim sonunda fazla miktarda oluşan peyniraltı suyunun büyük bir kısmı ülkemizde hemen hemen hiç değerlendirilmeden atık madde olarak çevreye verilmektedir. Fakat süt endüstrisinin gelişmiş olduğu ülkelerde peyniraltı suyundan yem, ilaç, etil alkol ve laktoz üretimi gibi çeşitli alanlarda yararlanılmaktadır [3].

Biyoteknoloji ve çevre teknolojilerindeki gelişmelere bağlı olarak endüstriyel atık maddelerden biyosürefektan üretilmesine olan ilgi artmıştır. Biyosürefektanlar; mikroorganizmalar tarafından üretilen hidrofilik ve hidrofobik kısım içeren hücrelerin yüzeylerinde bulunan veya hücre dışına salınan katı, sıvı, gaz molekülleri arasındaki yüzey ve iç yüzey gerilimi azaltabilen yüzey aktif bileşiklerdir[4, 5, 6, 7].

*P.aeruginosa* çeşitli karbon kaynaklarında bir veya iki tane ramnoz şekeri ve çeşitli uzunluklarda yağ asitleri içeren glikolipit yapısında biyosürefektanlar sentezlemektedir. Yapısında bir tane ramnoz şekeri ve buna bağlı yağ asitleri varsa monoramnolipit, iki tane ramnoz şekeri ve yağ asitleri varsa diramnolipit adı verilmektedir. Ramnolipitler hücre duvarının yapısında bulunuyorsa hidrokarbonlu bileşiklerin periplazmik yüzeye penetrasyonunu kolaylaştırmakta ve/veya hücre dışına salındıklarında ise hidrokarbonlu bileşikleri emülsifiye etme özelliğine sahiptirler [2, 7, 8].

Ramnolipitlerde bulunan ramnoz şekerleri bileşiğe hidrofilik özellik kazandırırken, yağ asitlerine eklenen karbon molekülleri hidrofobik özelliğini artırmaktadır. Bu özellikler ramnolipitlerin sağlamlığını ve hidrofobik bileşikleri çözünebilme kapasitesini etkilemektedir. Bu nedenle ramnolipitler kara ve denizlere dökülmüş kirleticilerin temizlenmesinde,

petrol taşıyan boru ve depolarda vizkoziteyi artırmada, aromatik ve alifatik hidrokarbonlu bileşiklerin ortamdan kaldırılmasında, petrol endüstrisi, tarım, tıp, kozmetik ve çevre biyoteknoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır [6, 7, 8].



**Şekil 1.** *Pseudomonas aeruginosa* tarafından sentezlenen mono ve di-ramnolipitler.

Bu çalışmada; süt fabrikalarının atığı olan peyniraltı suyunun hem çevreye zarar vermeden değerlendirilmesi hem de endüstrinin birçok alanda kullanılan yüzey ve iç yüzey gerilimi azaltabilen ramnolipit biosümfektanlarının üretilmesi amaçlanmıştır. Bunun için çalışmada ön işlemlerden geçirilmiş peyniraltı suyu besiyortamında *P.aeruginosa*'nın toplam hücre sayısı, ramnolipit miktarı, indirgen şeker miktarı ve kimyasal oksijen yükü araştırılmıştır.

## 2.MATERYAL VE METOD

### 2.1. Kullanılan Mikroorganizma

Çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 kullanılmıştır. Mikroorganizma Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvar koleksiyonundan temin edilmiştir.

### 2.2. Kullanılan Besi ortamları

Besiyortamı olarak Elazığ Süt fabrikasından temin ettiğimiz peyniraltı suyu kullanılmıştır. Peyniraltı suyu kullanılmadan önce ön işlemlerden geçirilmiştir. Bunun için; Peynir altı suyu 1,1 atmosfer basınç altında

121°C'de 15 dakika süreyle otoklavlanmış ve bir gece +4 °C'de bekletildikten sonra yeşilimsi sarı renkte berrak peyniraltı suyu besiyortamı olarak kullanılmıştır.

### 2.3. Besiyortamlarına Ekim ve Bakteri Kültürünün Geliştirilmesi

*P. aeruginosa* DSM 50071'nin ekimi için stok kültürlerin bulunduğu yatık Nutrient agar tüplerine McFarland 2 (%1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'den 9,8 ml + %1'lik BaCl<sub>2</sub>'den 0,2 ml) bulanıklık tüpüne eşdeğer bulanıklığa gelinceye kadar steril serum fizyolojik su (% 0,9 NaCl) ilave edilmiş ve homojen bir bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyon besiyortamlarına 1/20 (v/v) oranı olacak şekilde steril koşullarda ekim yapılmıştır. Kültürler 150 rpm'de 37°C'de çalkalamalı etüvde geliştirilmiştir [9].

### 2.4. Besiyortamlarında Toplam Hücre Sayısının Belirlenmesi

Besiyortamlarındaki toplam bakteri hücre sayısı McFarland yöntemine göre hesaplanmıştır [9].

### 2.5. Besiyortamından Ramnolipit Biyosülfektanı Ekstraksiyonu ve Miktarının Belirlenmesi

Ramnolipit ekstraksiyonu inkübasyon süresi sonunda besiyortamının pH'sı 10 M NaOH ile pH 8'e ayarlanmış ve 20 dakika 5 000 devirde santrifüj edilmiştir. Daha sonra 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile besiyortamının pH'sı 2'ye ayarlanmış ve eşit hacimde Kloroform:Metanol (2:1) karışımı ilave edilmiştir. Çalkalamalı etüvde 10 dakika çalkalandıktan sonra 5000 devirde 10 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Ekstraksiyon bir kere daha tekrarlanmıştır. Sonra metanol'de çözüldürülüp 0,22µm'lik miliporlardan filtre edilmiş ve açık sarı renkte ürün elde edilmiştir. Ramnolipit miktarını bulmak için yukarıda belirtildiği gibi ekstrakte edilen örnekler Dubois ve ark. önerdiği Fenol Sülfürik Asit metoduna göre 480 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak hesaplanmıştır [8, 10].

### 2.6. İndirgen Şeker Miktarının Ölçülmesi

Besiyortamındaki indirgen şeker miktarı Dinitrosalisik asit yöntemine göre yapılmıştır. Bu amaç için 0,5 ml örnek üzerine 1,5 ml Dinitrosalisik asit ilave edilmiş tüpler 10 dakika süre ile kaynar su banyosunda tutulmuş ve soğuduktan sonra spektrofotometre'de 550 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak hesaplanmıştır [2, 11].

## 2.7. Kimyasal Oksijen İsteğinin Ölçülmesi

Kimyasal oksijen istek yükü Rant ve ark. önerdiği yöntemle göre yapılmıştır [12]. 20 ml örnek (bakteri hücrelerinden arındırılmış ve 1/100 oranında sulandırılmış kültür ortamı) üzerine 5 ml gümüş sülfatlı sülfirik asit ile 0,4 gr HgSO<sub>4</sub> ilave edilip karıştırılmıştır. Bu karışıma 10 ml 0,25 N K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> ilave edildikten sonra 25 ml gümüş sülfatlı sülfirik asit çözeltisi yavaşca ilave edilip iyice karıştırılmıştır. İki saat süre ile kaynatılan balonlar soğutulup toplam hacim 140 ml olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Balonlardaki örneklerin her birisine 2-3 damla ferroin indikatörü ilave edilmiş ve 0,1 N demir amonyum sülfat (Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) ile renk kırmızıya dönünceye kadar titre edilmiştir. Titrasyon sonucu K.O.I. yükü mg/l cinsinden aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [2].

$$\text{K.O.I. (mg/l)} = \frac{(V_0 - V_1) \times N \times 8000}{V}$$

V<sub>0</sub> = Köre sarf edilen demir amonyum sülfat miktarı  
V<sub>1</sub> = Örneğe sarf edilen demiramonyum sülfat miktarı  
V = Alınan ml numune miktarı  
N = Demiramonyum sülfat normalitesi

## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

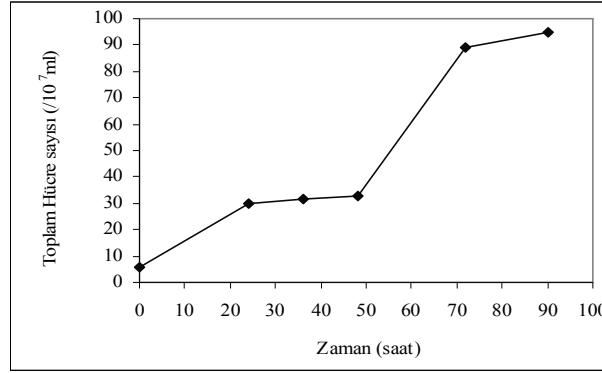
Yapılan çalışmalarda, *P.aeruginosa*'nın hidrokarbon, karbonhidrat ve yağ gibi farklı karbon kaynaklarında ramnolipit biyosümfektanı sentezlediği belirtilmiştir [12, 13, 14]. Bu çalışmamızda süt endüstrisinin atık maddesi olan peyniraltı suyu karbon kaynağı olarak kullanılarak ramnolipit biyosümfektanı elde etmesi amaçlanmıştır. Çalışmada *P.aeruginosa* DSM 50071'in peyniraltı suyu besiyortamında toplam hücre sayısı, ramnolipit miktarı, indirgen şeker miktarı ve kirlilik yükü parametrelerinden olan kimyasal oksijen isteği (KOI) araştırılmıştır.

Peyniraltı suyu; sahip olduğu organik bileşikler ve minarel maddeler nedeniyle mikroorganizmaların üreme ve çoğalmasını engelleyici bir özelliğe sahiptir [3].

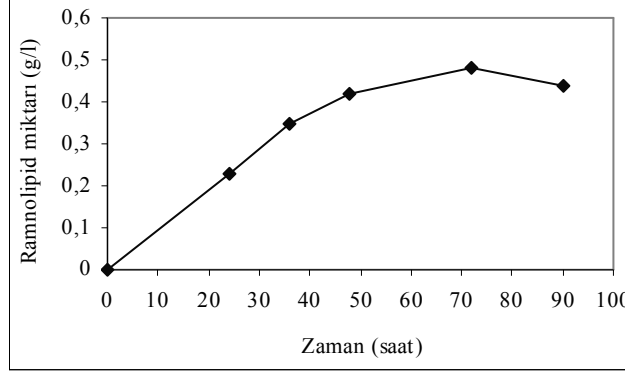
Yapılan çalışma sonunda peyniraltı suyunda *P.aeruginosa* bakterilerinin üreme ve çoğalma gösterdiği ve 90. saate toplam hücre sayısı 9,5 x10<sup>9</sup>/ml

olduğu tespit edilmiştir. Ramnolipit biyosülfektanı miktarı ile zamanla artışı ve en yüksek ramnolipit biyosülfektanı miktarı ise 72. saat'te 0,48 g/l olduğu görülmüştür. Aynı zamanda indirgen şeker miktarının ise zamana bağlı olarak 3,1 g/l'den 2,6 g/l'ye düştüğü görülmüştür (şekil 3.1. 3.2. ve 3.3). Ramnolipit biyosülfektan üretimi üzerine yapılan çalışmalar ramnolipitlerin sekonder metabolizma ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Ramnolipit biyosülfektan elde edilmesi için en uygun inkübasyon süresinin 72 saat olduğunu bildiren çalışmaların yanı sıra 24, 90 ve 120 saatler olduğunu bildiren çalışmalarda bulunmaktadır [2, 13, 14].

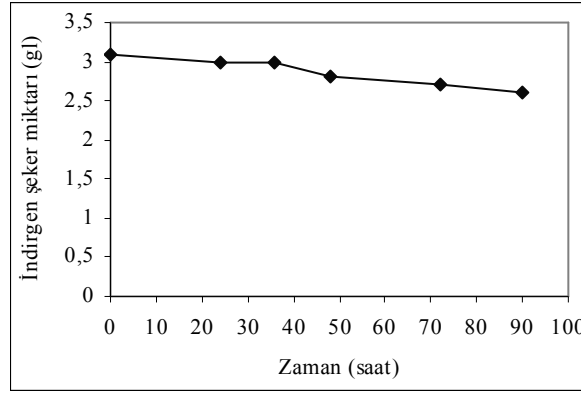
Dubey ve Juwarkar (2001); yağlardan izole ettiği *P.aeruginosa* BS2 kültürlerinin peyniraltı suyunda 0,92 g/l ramnolipit biyosülfektanı elde ettiğini ve peyniraltı suyunun ramnolipit biyosülfektan üretiminde uygun bir substrat olduğunu bildirmişlerdir [15].



Şekil 3.1. Peyniraltı suyu besiyortamında *P.aeruginosa* DSM 50071'in toplam hücre sayısı



**Şekil 3.2.** Peyniraltı suyu besiortamında *P.aeruginosa* DSM 50071'in ramnolipit miktarı.



**Şekil 3.3.** Peyniraltı suyu besiortamında *P.aeruginosa* DSM 50071'in indirgen şeker miktarı.

Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz ramnolipit miktarı bu kadar yüksek olmamıştır. Bunun nedeni kullanılan mikroorganizmaların ve besiortamının içeriklerinin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Mikroorganizmaların ramnolipid biyosülfektanı üretip üretmemesi daha çok mikroorganizmanın cinsine bağlıdır. *Pseudomonas* türleri diğer türlere göre daha fazla ramnolipit biyosülfektanı üretmektedir. Fakat *Pseudomonas* türlerinin cevapları birbirlerinden farklıdır [4, 6,12].

Yapılan çalışmalar ramnolipit üretiminde karbon kaynaklarının önemli olduğunu göstermektedir. Benzer çalışmalarda; Itoh ve ark. (1971); parafin

üzerinde gelişebilen *P.aeruginosa* KY 4025'in 17 g/l, Osman ve ark (1996) etanol ortamında *Pseudomonas* sp. BOP100 32 g/l, Babu ve ark (1996) sükröz ortamında *P.aeruginosa* BS2'nin 5,8g/l ramnolipit, biyosüpfektanları sentezlediklerini bildirmişlerdir [16 , 17, 18].

Farklı karbon kaynaklarının ramnolipit biyosüpfektanı üretimi üzerine yapılan çalışmalarda mannitol ve gliserol içeren kültür ortamlarında ramnolipit biyosüpfektan üretiminin daha yüksek olduğunu ancak mannitol ve gliserol maliyetleri yüksek karbon kaynakları olduğu için endüstriyel uygulamalar için pek tercih edilmediği belirtilmiştir.

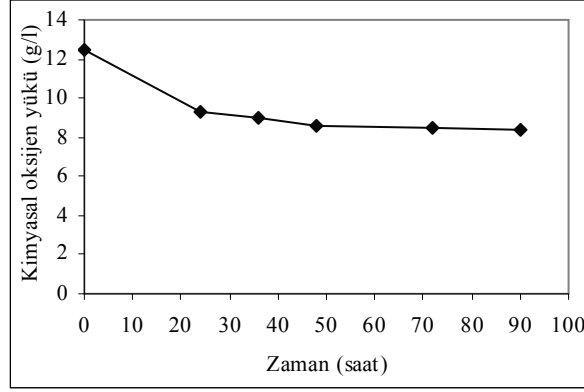
Mercada ve ark (1993); ramnolipit üretiminde zeytinyağı atıklarının kültür ortamı olarak kullanılması üzerine yaptığı çalışmada, zeytinyağı fabrika atığında dendiği 22 mikroorganizma kültürlerinden sadece 15 tanesinin geliştiğini bunlarında genelde *Pseudomonas* türlerine ait kültürler olduğunu bildirmişlerdir [13].

Mercada ve ark (1993) zeytinyağı atığının mikroorganizmalar tarafından biyosüpfektan üretiminde substrat olarak kullanılabileceğini, Abolos ve ark (2001) ramnolipit üretiminde soya yağı atığının, Patel ve ark (1997), şeker fabrikası atık maddelerinin ramnolipit biyosüpfektan üretiminde besiyortamı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir [13, 19, 20].

Atık maddeler çevreye bırakıldıkları zaman ortamdaki organik bileşiklerle, mineral maddelerle veya organizmalarla sıkı bağlar kurmakta ve çevreye zarar vermektedir. Özellikle organizmaların yapısında birikerek toksik, kanserojenik ve mutajenik etki yapmaktadır. Bu nedenle atık maddelerin hem bu tür etkilerinin veya kirlilik yüklerinin ortadan kaldırılması veya azaltılması hem de tekrar ham madde olarak değerlendirilerek ekonomiye kazandırılması oldukça önemlidir.

Yaptığımız çalışmada peynir altı suyunun kirlilik yükü göstergelerinden olan kimyasal oksijen isteğinin (KOİ) ise % 27 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.4).





**Şekil 3.4.** Peyniraltı suyu besiyortamında *P.aeruginosa* DSM 50071'in kimyasal oksijen yükü

Sonuç olarak süt fabrikalarının atık maddesi olan peyniraltı suyu'nun karbon kaynağı olarak ramnolipit biyosüpfektanı elde edilmesinde kullanılabileceği ve böylece tekrar ekonomiye ham madde olarak geri kazandırılacağı tespit edilmiştir.

#### 4. KAYNAKLAR

1. Telefoncu A., Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi Yayınları, Bornova-İzmir, (1995).
2. Sidal U., Kolonyaka N., Kurtonur C., *Pseudomonas* sp. ile Zeytinyağı Fabrikası Atığından Biosüpfektan Elde Edilmesi, Turkish Journal of Biology, 24: 611-625, (2000),
3. Özrenk E., Demir S., Tüfenkçi Ş., Peynir altı Suyu Uygulaması İle *Glomus intraradices* ve *Rhizobium cicer* İnokülasyonlarının Nohut Bitkisinde Bazı Gelişim Parametrelerine Etkileri. Yüzüncü yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric Sci) 13 (2) 127-132, (2003)
4. Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S., Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants, Applied Microbiology and Biotechnology, 53: 495-508.,(2000)
5. Van Dyke M.I., Lee H., Trevors J.T., Applications of Microbial Surfactants, Biotechnology, 9: 241-252., (1991)
6. Maier R.M., Soberon-Chavez G., *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids: Biosynthesis and Potential Applications, Applied Microbiology and Biotechnology, 54: 625-633, (2000)

7. Lang S., Wullbrandt D., Rhamnose lipids-Biosynthesis Microbial Production and Application Potential, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1): 22-32. (1999)
8. Mata-Sandoval JC., Karns J., Torrents A., High-performance Liquid Chromatography Method for The Characterization of Rhamnolipid Mixtures Produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on Corn oil, *Journal of Chromatography A*, 864: 211-220. (1999).
9. Gürgen V., Halkman AK., Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:7 Ankara, (1988).
10. Dubois M., Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA., Smith F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28: 350-356. (1956).
11. Miller G.L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar *Analytical Chemistry*, 31: 426-428. (1959).
12. Makar R.S., Cameotra SS., An Uptake on use of Unconventional Substrates For Biosurfactant Production and Their New Applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 428-434. (2002).
13. Mercada M.E., Manresa A., Robert M., Espuny MJ., De Andres C., Guinea J., Olive Oil Mill Effluent (OOME). New Substrate for Biosurfactant Production, *Bioresource Technology*, 43:1-6. (1993).
14. Ramana, K.V., Karanth, N.G., Production of Biosurfactants by the Resting Cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFRT-6. *Biotechnology Letters*. 11 (6). 437-442. (1991).
15. Dubey K., Juvarkar A., Distillery and Curd Whey Waste as Visible Alternative Source for Biosurfactant Production, *World of Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17:61-69. (2001).
16. Itoh, S., Honda, H., Tomita F., Suzuki T., (1971), Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. *Journal Antibiotics* 24:855-859.
17. Osman, M., Ishigami, Y., Someya, J., Jensen H.B., The Bioconversion of Ethanol to Biosurfactants and Dye by a Novel Co-Production Technique. *Journal of American Oil Chemicals Society* 73: 851-856. (1996).
18. Babu, P.S., Vaidya, A.N., Bal A.S., Kapur, R., Juvarkar A., Khanna P., Kinetics of Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* BS2 From Industrial Wastes. *Biotechnology Letters*. 18: 263-268. (1996).
19. Abolos A., Pinazo A., Infante MR., Casals M., Garcia F., Manresa A., Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes, *Langmuir*, 17: 1367-1371. (2001).
20. Patel, RM., Desai AJ., Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from Molasses. *Letters Applied Microbiology*, 25: 91-94. (1997).